

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-199890

(P2001-199890A)

(43)公開日 平成13年7月24日(2001.7.24)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード <sup>7</sup> (参考)	
A 6 1 K	31/5585	A 6 1 K	31/5585	4 C 0 8 6
	31/558		31/558	
A 6 1 P	13/12	A 6 1 P	13/12	
	25/00		25/00	
	25/16		25/16	
審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願2000-17745(P2000-17745)

(22)出願日 平成12年1月21日(2000.1.21)

(71)出願人 000006725

ウェルファイド株式会社

大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号

(72)発明者 保理江 智

埼玉県入間市小谷田三丁目7番25号 吉富

製薬株式会社創薬研究所内

(72)発明者 河村 透

大阪府大阪市中央区平野町二丁目6番9号

吉富製薬株式会社内

(72)発明者 丸山 智之

大阪府枚方市招提大谷二丁目25番1号 吉

富製薬株式会社創薬研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞保護剤

(57)【要約】

【課題】 アポトーシスを抑制する有効投与量で血圧降下を起こさない細胞保護剤を提供すること。

【解決手段】 P G K<sub>1</sub>、P G K<sub>2</sub>またはピシクロ P G E<sub>2</sub>を有効成分とする細胞保護剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>、ビスクロPGE<sub>2</sub>、その塩、またはその誘導体を有効成分とする細胞保護剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は細胞保護剤に関する。

【0002】

【従来の技術】PG（プロスタグランジン）類はオタコイドとして、生体内において様々な生理活性を発現することが知られている。ところで、最近、PG類と細胞死（アポトーシス）の関係が注目されている。例えば、ある種のPG類はアポトーシスを抑制することが確認されている。このうち、PGE<sub>2</sub>とアポトーシスの関係については、特開平8-277222号公報、J. Neurochem.、72巻5号、1997~1998頁、1999年発行、などの報告がある。しかしながら、PGE<sub>2</sub>は血管拡張作用を有し、血圧降下を起こす可能性があるため、患者・病態によっては使いにくい臨床的状況が危惧される。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、細胞保護作用（アポトーシス抑制作用）に優れ、かつ、その有効投与量では血圧降下を起こさないPG類を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の事情を考慮してさらに研究を進めた結果、PGK<sub>1</sub>等の特定のPG類が優れた細胞保護作用を有し、かつその有効投与量では血圧降下を起こさないことを見出して、本発明を完成した。

【0005】本発明は、PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>、ビスクロPGE<sub>2</sub>、その塩、またはその誘導体を有効成分とする細胞保護剤に関する。以下に詳細を説明する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の細胞保護剤の有効成分は、PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>、ビスクロPGE<sub>2</sub>、その塩、またはその誘導体である。

【0007】PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>あるいはビスクロPGE<sub>2</sub>は公知の化合物である。ちなみに、PGK<sub>1</sub>は(13E, 15S)-15-ハイドロキシ-9, 11-ジオキソプロスト-13-エン-1-オイック・アシッド、PGK<sub>2</sub>は(5Z, 13E, 15S)-15-ハイドロキシ-9, 11-ジオキソプロスタ-5, 13-ジエン-1-オイック・アシッド、ビスクロPGE<sub>2</sub>は7-(4-ブチルオクタヒドロ-2, 5-ジオキソ-1H-インデン-1-イル)-5-ヘプタノイック・アシッドのことである。これらの化合物は、公知の手法に準じて調製することができる。また、市販品を入手することもで

きる（販売元はサイマン・ケミカル社、米国）。

【0008】本発明において塩としては、上記化合物のアルカリ土類金属塩、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩など、アルカリ金属塩、例えば、カルシウム塩など、アミノ化合物との塩、例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、N-メチルグルカミンなどが例示される。当該塩は公知の手法に準じて調製することができる。例えば、遊離のカルボン酸を有する、PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>またはビスクロPGE<sub>2</sub>と、塩を形成するための水酸化物（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム等）を水溶液中で共存させることにより、これらの塩を形成することができる。

【0009】本発明において誘導体としては、上記化合物のエステル体、アミド体などが例示される。エステル体としては、アルキルエステル、アルキルエーテルアルキルエステル、アルキルオキシカルボニルアルキルエステル、アルキルカルボニルオキシアルキルエステルなどが例示される。炭素数は置換基全体として1~20程度である。アルキルは直鎖型、分岐型のいずれでもよい。具体的には、メチル、エチル、n-プロピル、iso-プロピル、n-ブチル、iso-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-オクチル、n-デシルなどが例示される。

【0010】アミド体としては、アルキルアミド、ジアルキルアミドなどが例示される。炭素数は置換基全体として1~20程度である。アルキルの定義は上述のとおりである。

【0011】当該誘導体は公知の手法に準じて調製することができる。例えば、遊離のカルボン酸を有する、PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>またはビスクロPGE<sub>2</sub>を用いて、エステル化法、アミド化法により合成することができる。

【0012】本発明の化合物は公知の手法に準じて製剤化することができる。例えば、固形製剤、液剤を調製できる。固形剤としては、散剤、錠剤、カプセル剤等が挙げられる。また、液剤としてはエタノール液剤、シクロデキストリン包接体、リボソーム、脂肪乳剤等が挙げられる（特開平8-277222号公報参照）。

【0013】本発明の化合物は、優れたアポトーシス抑制作用を有することから、細胞、特に脳細胞、神経細胞あるいは腎細胞のアポトーシスを抑え、細胞保護剤として有用である。従って、これらの化合物は、神経疾患、神経変性を伴う疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、筋萎縮性側索硬化症、脊柱管狭窄症、あるいは腎炎、腎不全、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群などの腎疾患などの予防・治療に有用である。また、NO（一酸化窒素）による細胞障害を抑制することから、急性腎不全、薬剤性腎不全、慢性腎不全などのラジカルがアポトーシスと関与するような腎疾患の予防・治療にも有用である。しかも、これらの化合物は有効投与量では実質的に血管拡張作用・血圧降下作用を示さ

ないことから、血圧降下によって悪影響を受けることが懸念されるような患者・病態に対しても有用である。

【0014】本発明の細胞保護剤の投与経路としては、経口、非経口のいずれでもよい。また、その投与量は、患者の性別、年齢、病状、体重などに応じて適宜増減することができる。通常は成人1日当たり、0.1~1000 $\mu$ g程度が例示される。

【0015】

【実施例】本発明をより詳細に説明するために、以下に実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0016】実施例1（シクロデキストリン包接化）

本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>またはビスクロPGE<sub>2</sub>）17mgをエタノール0.2mlに溶解した溶液に $\beta$ -シクロデキストリン257mgを水6mlに加温溶解して調製した溶液を加え、45℃で混和した後に室温に戻し、沈澱を析出させた。これを0℃で一晩放置後に濾過し、50%エタノール水溶液で洗浄した後、滅菌乾燥することにより、シクロデキストリン包接化物を得た。

【0017】実施例2（リボソーム化）

卵黄ホスファチジルコリン60mgおよびオレイルアミン11mgをクロロホルム5mlに溶解した後に、本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>またはビスクロPGE<sub>2</sub>）30 $\mu$ gをエタノール100 $\mu$ lに溶解したものを加え、ナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。これに0.1M等張リン酸緩衝液（pH5）1mlを加え、振盪、超音波処理（ソニケート）および遠心分離した後、上清を0.2 $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過し、リボソーム製剤を得た。

【0018】実施例3（エタノール溶液）

本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>またはビスクロPGE<sub>2</sub>）500 $\mu$ gをエタノール1mlに溶解することにより、エタノール溶液剤を得た。これを用時、生理食塩液またはブドウ糖液等で希釈して用いる。

【0019】実施例4（脂肪乳剤化）

精製大豆油30gに高度精製卵黄リン脂質5.4g、本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>またはビスクロPGE<sub>2</sub>）1.5mgおよびオレイン酸0.72gを加え、40~75℃で加温溶解した。これに蒸留水200mlを加え、次いで、日本薬局方グリセリン7.5gを加え、20~40℃の蒸留水で全量を300mlとし、ホモジナイザーで粗乳化した。さらにマントン-ガウリン型ホモジナイザーで高圧乳剤し、均質化された微細の脂肪乳剤を得た。この乳剤の平均粒子径は0.15~0.4 $\mu$ mであり、1 $\mu$ m以上の粒子は含有しなかった。

【0020】実験例1

アミロイドベータペプチドによるアポトーシス誘導に対する本発明化合物の抑制効果を調べた。

1) ラット大脳皮質ニューロンの培養

胎生17または18日齢のラット胎児の大脳より皮質部位を氷冷下で摘出し、細断後、神経細胞分散液（SUMILON）を用いて、細胞を分散させた。その後、予め、ポリエチレンイミンコートした培養フラスコに細胞を1.5 $\times 10^5$ 個/cm<sup>2</sup>の密度で播き、4日間培養後、次の試験に供した。なお、培養液は、B27サプリメント（1/50容量）、2-メルカプトエタノール（27.5 $\mu$ M）、L-グルタミン酸（25 $\mu$ M）およびグルタミン（0.5mM）を添加したNeurobasal培地（ギブコ社製）を用いた。

【0021】2) アミロイドベータペプチドによるアポトーシスの誘導と本発明化合物の添加アミロイドベータペプチド25-35（A $\beta_{25-35}$ ）を、1mMの濃度になるように蒸留水に溶解し、37℃で約1週間インキュベートし、Aged-A $\beta_{25-35}$ を調製した。神経細胞へのアポトーシスの誘導は、10 $\mu$ MのAged-A $\beta_{25-35}$ を含む上記培養液（L-グルタミン酸は除く）に、交換することによって行った。また、本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>、ビスクロPGE<sub>2</sub>）をエタノールに溶解後、Aged-A $\beta_{25-35}$ を添加すると同時に培養液に添加した。その終濃度は1 $\mu$ Mとした。対照としてPGE<sub>2</sub>を用いた。各群とも例数3で行った。

【0022】3) アポトーシスの検出

アポトーシス誘導の24時間後、細胞をPBS（-）で洗浄し、1%グルタルアルデヒド溶液（PBS溶液）を用いて、室温で30分間固定した。次に、PBS（-）で2回洗浄後、1mMヘキスト33342溶液（PBS溶液）で約2分間反応させた。その後、蛍光顕微鏡下で、任意の4視野について核クロマチンの形態観察を行い、正常細胞数およびアポトーシス陽性細胞数（クロマチンの断片化または凝集を認める細胞）をカウントし、アポトーシス誘導抑制率（%）を算出した。結果を表1に示す。

【0023】実験例2

本発明化合物の血圧降下作用を調べた。正常ラット（雄性、体重約300g）をネンプタールの腹腔内投与で麻酔した後、背位に固定した。次いで、頸動脈にカニユーレを挿入し、血圧を圧トランスデューサー（日本光電）を介して測定し、ポリグラフ（日本光電）に連結して同時記録した。本発明化合物をエタノールに溶解後、生食で希釈し（200倍）、尾静脈より100 $\mu$ g/kg体重の投与量で投与し、平均体血圧（MBP）を測定した。投与前後の測定値から血圧降下度を算出した。対照としてPGE<sub>2</sub>を用いた。各群とも例数3で行った。結果を表1に示す。

【0024】

【表1】

薬物	アポトーシス誘導抑制率 (%)	血圧降下度 (%)
PGK <sub>1</sub>	45.4	-5
PGK <sub>2</sub>	36.2	+2
ビスクロPGE <sub>2</sub>	40.6	0
PGE <sub>1</sub>	38.2	-55

【0025】本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>、ビスクロPGE<sub>1</sub>）は実質的に血圧降下を起こさない投与量で、アポトーシスを十分に抑制することが可能であることが判明した。

#### 【0026】実験例3

腎細胞においてNO（一酸化窒素）によりアポトーシスを誘導させた。ラット尿細管上皮細胞株（主に遠位由来）であるNRK52E細胞をI型コラーゲンでコートしたチャンバースライドで24時間培養した。その後、培地を無血清培地に変え、NOドナーであるS-ニトロソ-L-グルタチオン（GSNO；1mM）を添加して\*

10 \*アポトーシスを誘導した。本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、ビスクロPGE<sub>1</sub>）をGSNOの添加と同時に終濃度1μMとなるように添加した。24時間後に1%グルタルアルデヒドで細胞を固定し、ヘキスト33342で細胞を染色した。1スライド当たり3視野を任意に選択し、視野中（倍率400倍）の全細胞数に対する核の断片化および凝集が生じている細胞数の割合を算出した。例数は5とした。結果を表2に示す。

【0027】

【表2】

薬物	アポトーシス発現率 (%)
ベヒクル（GSNO処理のみ）	13±1
PGK <sub>1</sub>	8±1**
ビスクロPGE <sub>2</sub>	6±1**

なお、数値は平均値±標準誤差を示す。\*\*はダンネット法で検定した時、ベヒクル群との間に危険率1%未満で有意差があることを示す。

【0028】本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、ビスクロPGE<sub>2</sub>）は腎細胞におけるアポトーシスを抑える、具体的には、尿細管上皮細胞株（NRK52E細胞）においてGSNOによるアポトーシス誘導を抑制することが判明した。

#### 【0029】実験例4

本発明化合物（PGK<sub>1</sub>、PGK<sub>2</sub>またはビスクロPGE<sub>2</sub>）をエタノールに溶解後、生食で希釈し（200倍）、正常ラット（雄性、体重約300g）の尾静脈より100μg/kg体重の投与量で投与したが、致死例は観察されなかった。

※

※【0030】

【発明の効果】本発明の化合物は、細胞保護剤（アポトーシス抑制剤）、特に脳細胞、神経細胞、腎細胞の保護剤として有用である。具体的には、神経疾患、神経変性を伴う疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症、脊柱管狭窄症、あるいは腎炎、腎不全、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群などの腎疾患などの予防・治療に有用である。また、NO（一酸化窒素）による細胞障害を抑制することから、急性腎不全、薬剤性腎不全、慢性腎不全などのラジカルがアポトーシスと関与するような腎疾患などの予防・治療にも有用である。特に、有効投与量で血圧降下を起こさないで、血圧降下によって悪影響を受けることが懸念されるような患者・病態に対しても有用である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A61P 25/28  
43/00

識別記号

F I

A61P 25/28  
43/00

ターマコード（参考）

(72)発明者 林 一孝

大阪府枚方市招提大谷二丁目25番1号 吉  
富製薬株式会社創業研究所内

(72)発明者 晶 利明

大阪府枚方市招提大谷二丁目25番1号 吉  
富製薬株式会社創業研究所内

(5)

特開2001-199890

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 DA05 MA01 MA03  
MA04 MA24 MA43 NA06 NA14  
ZA16 ZA81 ZC12 ZC41